

张梓豪,李 明,郑扬波,等. 硝酸铜对白木香细胞生长及抗氧化酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(5):106-109.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.05.026

硝酸铜对白木香细胞生长及抗氧化酶活性的影响

张梓豪,李 明,郑扬波,吴燕燕

(广东药科大学中药学院/国家中医药管理局岭南药材生产与开发重点研究室,广东广州 510006)

摘要:通过在白木香细胞液体培养基中添加外源硝酸铜 $[Cu(NO_3)_2]$ 与其共培养的方法,检测白木香细胞的生长情况、细胞活力、铜离子(Cu^{2+})含量、丙二醛(MDA)含量、过氧化氢(H_2O_2)含量以及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性。结果表明,在50、100、200 $\mu mol/L$ $Cu(NO_3)_2$ 与白木香共培养24 h,白木香的细胞活力较对照呈显著下降,随处理浓度的增加而显著降低。培养至72 h,随着 $Cu(NO_3)_2$ 浓度的增加,其细胞鲜质量、干质量均较对照呈显著降低的变化。在检测的时间内, $Cu(NO_3)_2$ 处理组白木香细胞的 Cu^{2+} 含量、 H_2O_2 含量、MDA含量均较对照有显著升高的变化,且随浓度的升高而升高, $Cu(NO_3)_2$ 处理组细胞的SOD、CAT、POD活性均随 $Cu(NO_3)_2$ 浓度的增加而较对照显著升高。可以看出,一定浓度的外源硝酸铜能够抑制白木香细胞生长和降低其活力,并导致白木香细胞发生氧化胁迫。

关键词:硝酸铜;白木香细胞;细胞活力;抗氧化酶

中图分类号:S718.43 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)05-0106-04

白木香[*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg]是瑞香科植物,其木质部在受到外界环境胁迫(机械损伤、化学刺激、病虫害侵染等)后会产生和积累次生产物,即结香^[1]。白木香结香是其在受到环境胁迫的条件下,体内的自我防御的生理生化

响应过程。近年来,张争等提出了“白木香防御反应结香假说”^[2],认为物理损伤,化学、真菌诱导子侵染等外界刺激能够诱导白木香发生防御反应,并诱导产生次生产物的积累。

铜是一种高等植物生长发育过程中必需的重要微量元素,对植物的生长发育、品质及产量等有重要影响,对于药用植物的次生产物积累也有一定的影响^[3]。研究表明,在一定浓度的铜刺激植物后,植物体内的活性氧(ROS)得到积累,并激发了细胞的自身防御系统清除过量积累的ROS,表现出抗氧化酶活性的升高,而过高浓度的铜能够使植物体内的活性氧大量积累,并且超出细胞自身的抵御能力,对细胞的结构和功能造成了严重的破坏,造成抗氧化酶系统严

收稿日期:2018-07-03

基金项目:广东省科技计划(编号:2013B020503066、2014A020208133、2016A020226050)。

作者简介:张梓豪(1993—),男,广东佛山人,硕士研究生,主要从事中药资源与质量研究。E-mail:1092292441@qq.com。

通信作者:李 明,博士,教授,主要从事中药资源及品质评价研究。E-mail:13539843803@163.com。

induced by low temperature stress[J]. Plant Cell Reports,2007,26:1111-1120.

[8]宋成英,封加福. HPLC同时测定黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄芪甲苷[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):115-117.

[9]张贺廷,王 健,程铭恩,等. 蒙古黄芪主产区栽培及商品规格等级调查[J]. 中药材,2015,38(12):2487-2492.

[10]秦雪梅,何 盼,李震宇,等. 黄芪的名称考证[J]. 中药材,2014,37(6):2487-2492.

[11]张艺莲. 延边中草药材的资源及其利用情况[J]. 中国民族民间医药杂志,2001(52):285-289.

[12]李 波,肖井雷. 延边朝鲜族自治州中药资源调查研究[J]. 吉林中医药,2015,35(8):823-825.

[13]Kim G S, Lee D Y, Lee S E, et al. Evaluation on extraction conditions and HPLC analysis method for bioactive compounds of astragali radix[J]. Korean J Medicinal Crop Science,2013,21(6):486-492.

[14]李子羊,刘 佳,孙海燕,等. IBA浓度对膜荚黄芪不定根生物量、毛蕊异黄酮及毛蕊异黄酮葡萄糖苷积累的影响[J]. 延边大

学农学学报,2016,38(3):209-213.

[15]Akula R, Ravishankar G A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants[J]. Plant Signal Behavior,2014,6(11):1720-1731.

[16]Pan H, Li X, Cheng X, et al. Evidence of calycosin-7-O- β -D-glucoside's role as a major antioxidant molecule of *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao plants under freezing stress [J]. Environmental & Experimental Botany, 2015, 109:1-11.

[17]李光跃,罗晓雅,孙窗舒,等. 干旱胁迫对黄芪植株生长中黄酮类成分积累的影响[J]. 西北植物学报,2017,37(1):138-143.

[18]杨春清,孙明舒,丁万隆. 黄芪病虫害种类及为害情况调查[J]. 中国中药杂志,2004,29(12):67-70.

[19]张淑珍,王维峰,西 芳,等. 杨庆凯大豆抗疫霉根腐病机制的研究进展[J]. 大豆科学,2001,20(4):290-294.

[20]李 娜,于希森,李 琪,等. 大豆异黄酮合成关键酶基因对蚜虫取食的防御响应分析[J]. 大豆科学,2016,35(5):800-804.

[21]宋 超,靳晓丽,田新会,等. 不同红三叶品种生产性能及异黄酮含量的比较[J]. 草原与草坪,2012,32(5):47-52.

重失衡。

本试验研究了外源铜离子对白木香细胞的生长、活力及抗氧化酶活性的影响,为研究铜离子对白木香细胞的影响,以及今后可能在白木香香精中的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

1.1.1 白木香细胞的培养 参考董闪等的方法^[4],培育白木香愈伤组织。挑取培养 14 d 的愈伤组织,接种至 40 mL 的 1/2MS + 6-BA 1.5 mg/L + 2,4-D 2.0 mg/L 液体培养基中,置于(25±1)℃的恒温摇床上,在光照时间为 12 h/d、转速为 130 r/min 的条件下培养。本试验在广东药科大学(23°20'N, 113°30'E;年降雨量为 1 623.6~1 899.8 mm;海拔为 18 m;温度为 24~32℃)中药楼进行。

1.1.2 硝酸铜处理 将过滤 0.45 μm 滤膜的不同浓度硝酸铜溶液加入到白木香细胞培养液中共培养,定期每天 09:00 取样检测各项指标。

1.2 测定指标及方法

1.2.1 细胞鲜质量和干质量的测定 参照孙盈盈的试验方法^[5]略加修改。每 24 h 取出经硝酸铜溶液处理的白木香细胞,采用称质量法测定细胞的鲜质量;置于 80℃烘箱烘约 12 h 至恒质量,称量细胞干质量。每个处理重复 3 次。

1.2.2 细胞活力测定 参考 Mikula 等的方法^[6],采用 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)法分别进行细胞活力检测。

1.2.3 细胞内铜离子(Cu²⁺)含量测定 参考《中国药典》2015 版^[1],采用硝酸-高氯酸(4:1)法进行消解。

1.2.4 丙二醛(MDA)含量测定 提取液制备和含量测定参照李合生的方法^[7],并略作改进。

1.2.5 过氧化氢(H₂O₂)含量测定 提取液制备和含量的测定参照饶力群等的方法^[8-9],并略作改进。

1.2.6 过氧化物酶液制备及其活性测定 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)酶液的制备和活性测定参照张志良等的方法^[10]。

1.3 数据分析

采用 Excel 2013 和 SPSS 19.0 统计软件对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 Cu(NO₃)₂ 对白木香细胞生长的影响

试验结果表明,白木香细胞在与不同浓度的铜离子共培养 72 h 起,随着 Cu(NO₃)₂ 浓度的增加,其细胞鲜质量、干质量均较对照显著降低的变化($P<0.05$)。培养至 96 h 时,50、100、200 μmol/L Cu(NO₃)₂ 处理的白木香细胞鲜质量、干质量分别较对照降低了 22.97%、42.42%、49.98% 和 13.65%、26.42%、33.17% (图 1、图 2)。

2.2 Cu(NO₃)₂ 对白木香细胞活力的影响

用 50、100、200 μmol/L Cu(NO₃)₂ 与白木香共培养 24 h 后,白木香的细胞活力随 Cu(NO₃)₂ 浓度的增加呈显著降低的变化($P<0.05$)。培养 72 h 时,50、100、200 μmol/L Cu(NO₃)₂ 处理的细胞活力较对照组分别降低了 72.98%、85.86%、91.66% (图 3)。

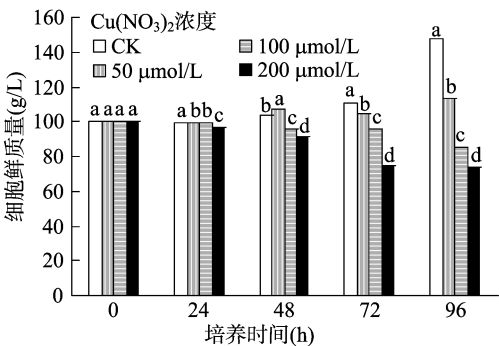


图1 不同浓度的 Cu(NO₃)₂ 对白木香细胞鲜质量的影响

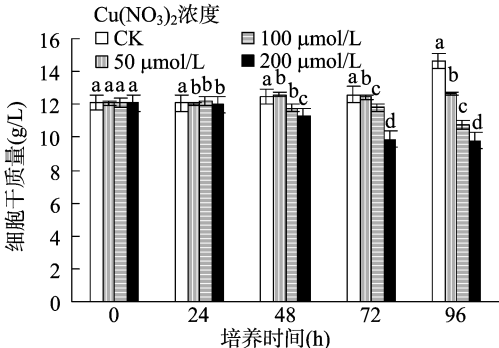


图2 不同浓度的 Cu(NO₃)₂ 对白木香细胞干质量的影响

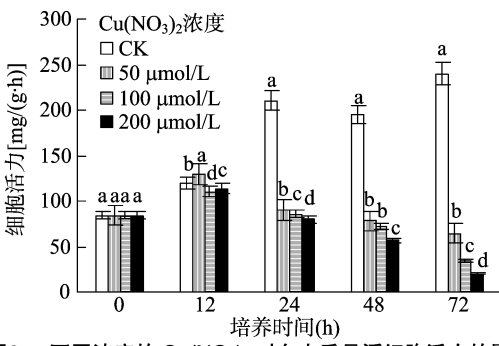


图3 不同浓度的 Cu(NO₃)₂ 对白木香悬浮细胞活力的影响

2.3 Cu(NO₃)₂ 对白木香细胞 Cu²⁺ 含量的影响

由表 1 可见,用 50、100、200 μmol/L Cu(NO₃)₂ 与白木香细胞共培养,在检测的时间内,细胞的 Cu²⁺ 含量均较对照有显著升高的变化,且随浓度的升高而升高。在培养 72 h 时细胞 Cu²⁺ 含量分别较对照组升高了 9.78%、54.29% 和 606.90% ($P<0.05$)。

表 1 外源铜离子对白木香细胞内 Cu²⁺ 含量的影响

时间 (h)	Cu ²⁺ 含量 (mg/kg)			
	CK	50 μmol/L	100 μmol/L	200 μmol/L
12	4.93 ± 0.03a	9.45 ± 0.25b	15.49 ± 2.56c	77.36 ± 3.23d
72	12.47 ± 0.26a	13.69 ± 0.48b	19.24 ± 1.23c	88.15 ± 2.35d

注:同行数据间标有不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.4 Cu(NO₃)₂ 对白木香细胞 MDA 含量的影响

由图 4 可知,用 50、100、200 μmol/L Cu(NO₃)₂ 与白木香细胞共培养,在检测 6~72 h,细胞的 MDA 含量均较对照有显著升高的变化,且随浓度的升高而升高。在培养 72 h 时细胞 MDA 含量分别较对照组升高了 65.98%、118.89%、181.69%

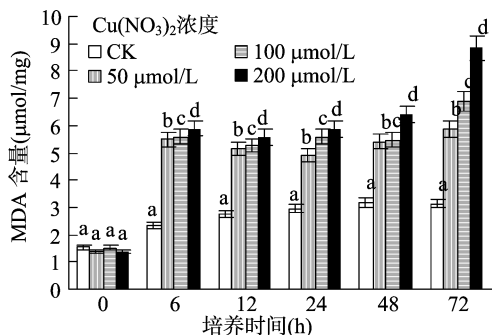


图4 不同浓度的 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 对白木香细胞的 MDA 含量的影响

($P < 0.05$)。

2.5 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 对白木香细胞过氧化氢含量的影响

用 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 与白木香细胞共培养,在检测的 12–72 h,白木香细胞的 H_2O_2 含量均较对照有显著升高的变化,且随浓度的升高而升高。在培养 72 h 时,细胞内 H_2O_2 含量分别较对照组升高了 33.59%、56.84%、75.69% ($P < 0.05$) (图 5)。

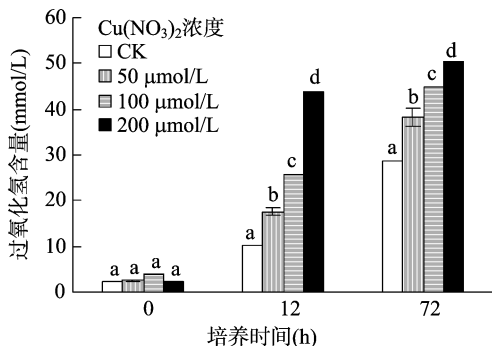


图5 不同浓度 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 对白木香悬浮细胞 H_2O_2 含量的影响

2.6 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 对白木香细胞 SOD 活性的影响

用 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 与白木香细胞共培养,在培养 6–72 h 时,细胞的 SOD 活性均随 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 浓度的增加而较对照显著升高。在培养 24 h 时,各处理的细胞 SOD 活性最强,50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 处理的细胞 SOD 活性分别比对照升高了 171.16%、187.74%、260.30% ($P < 0.05$),随后各浓度的处理均呈降低的变化,但均显著高于对照(图 6)。

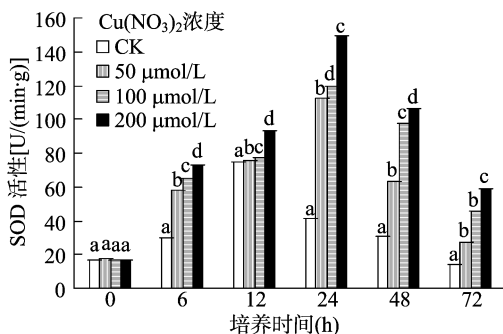


图6 不同浓度的 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 对白木香细胞 SOD 活性的影响

2.7 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 对白木香细胞 CAT 活性的影响

用 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 与白木香细胞共培养,在检测的 6–72 h,细胞的 CAT 活性均较对照有显著升高的

变化,且随浓度的升高而升高,在培养 24 h 时,CAT 活性达到最高,分别较对照升高了 22.37%、83.00%、96.33% ($P < 0.05$),随后各浓度的处理均呈降低的变化,但均显著高于对照(图 7)。

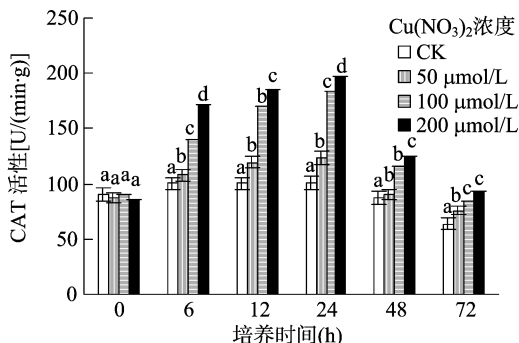


图7 不同浓度的 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 对白木香细胞 CAT 活性的影响

2.8 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 对白木香细胞 POD 活性的影响

50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 与白木香细胞共培养 6–72 h,细胞的 POD 活性均较对照有显著升高的变化,且随浓度的升高而升高。各处理在培养 48 h 时,POD 活性达到最高值,分别比对照升高了 131.76%、182.46%、202.54% ($P < 0.05$),随后呈降低的变化,但均显著高于对照(图 8)。

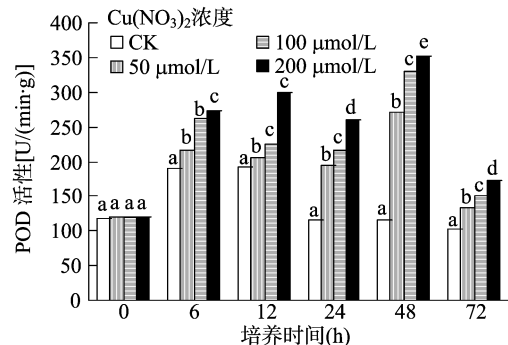


图8 不同浓度的 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 对白木香细胞 POD 活性的影响

3 讨论

铜离子不仅是许多酶(包括参与呼吸的细胞色素 C 氧化酶、参与活性氧清除以及引起酚类物质氧化褐变、促进次生代谢、产生防御反应的多酚氧化酶等)的辅基^[11–12],而且是植物体内生长发育所需的微量营养元素,植物如缺乏铜离子会导致其叶绿素的缺失、光合作用受阻^[8]、根系活力的下降^[13]等。但外源如土壤中的铜离子过量则会胁迫植物产生活性氧,并且会打破其清除机制的动态平衡,造成氧化伤害^[14]。廖建良等研究表明,铜离子浓度超过 10 mg/L 时,金针菇的生长受到抑制,且部分细胞的有丝分裂出现异常^[15]。王蕊等对豌豆苗的研究发现,100mg/L 铜离子会抑制其幼苗根生长、芽长的伸长,且导致其体内 SOD、POD、CAT 等活性的下降,MDA 含量升高^[16]。

本研究表明,在不同铜离子浓度胁迫下,白木香悬浮细胞生长受到不同程度的影响。在培养 24 h 时,细胞活力呈现明显下降,处理组细胞活力较对照组降幅都达 50% 以上,且其细胞活力随处理时间的增加而下降,在同一处理时间,细胞活力随外源铜离子浓度增加显著降低。细胞鲜质量、干质量在

培养 48 h 时,随处理浓度的增加在一定范围内显著下降,在培养 72 h 时,下降幅度最大。

药用植物体内铜离子浓度标准不能超过 20 mg/kg^[17]。本研究表明,细胞内铜离子含量随着外源铜离子浓度增加而升高,在硝酸铜诱导细胞的 12 h 时,检测到 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度处理组的细胞内铜含量分别为 9.45、15.49 mg/kg,在高铜胁迫 72 h 下的白木香悬浮细胞内的铜离子含量显著增加,较对照组升高了 606.90%,说明外源铜浓度的增加与细胞内铜离子含量的增加呈正相关。

H_2O_2 是一种广泛存在于植物体内各种代谢途径中的活性氧,同时也是植物体内普遍存在的一类重要的防御氧化反应相关的信号分子^[18-19]。MDA 是用于表达膜质过氧化程度的指标,其值越高,表示膜质过氧化程度越高,细胞损伤越严重^[20]。通过对白木香细胞中 MDA 含量的检测发现,随着铜离子浓度的升高,白木香悬浮细胞内的 MDA 含量、 H_2O_2 含量也显著升高,推测白木香细胞在胁迫下,细胞膜脂发生了氧化胁迫反应。植物自身体内具有清除活性氧的体系,主要由 SOD、CAT、POD 等酶组成。SOD 是抗氧化防御中的一个关键酶,用于清除体内的超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$),降低在胁迫作用下细胞膜受到的损害。CAT、POD 2 种酶具有类似的功能,主要是清除体内过量的 H_2O_2 活性氧,降低 ROS(活性氧)的浓度^[21-23]。本研究显示,白木香细胞在 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的外源铜离子胁迫下,其体内 POD、SOD、CAT 活性随处理时间的延长呈先升后降的变化趋势,且在同一检测时间内,其活性均随着硝酸铜浓度的升高而升高,其中,在诱导的 24 h 时,CAT、SOD 活性达到最高值,在 48 h 时,SOD、CAT 活性出现下降的情况,表明细胞内的保护酶系统可能受到破坏,2 种酶的作用下降,无法清除体内过量的 ROS。POD 活性随浓度的升高而升高,至 48 h 时达到高峰,随后下降。这些结果与已报道的部分研究结果相似^[24-25]。

本研究表明,在较高浓度的外源铜离子影响下,白木香细胞体内发生氧化胁迫反应,细胞生长受到一定程度的抑制,细胞 H_2O_2 含量增加,MDA 含量升高,细胞抗氧化酶活性升高。外源铜离子作为一种诱导子,可诱导白木香细胞抗氧化酶活性等指标产生变化,在细胞体内铜离子浓度最低标准前提下,如何利用外源铜离子诱导白木香细胞次生产物和有效成分的产生和积累,有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:173.
- [2] 张争,杨云,魏建和,等. 白木香茎中内源茉莉酸类和倍半萜类物质对机械伤害的响应[J]. 园艺学报,2013,40(1):163-168.
- [3] 管虹. 铜离子对不同品种葡萄试管苗毒害机理的初步研究[D]. 济南:山东师范大学,2009:3-11.
- [4] 董闪,李明,唐堃,等. 白木香愈伤组织的诱导及培养[J]. 湖北农业科学,2014,53(15):3673-3677.
- [5] 孙盈盈. 测量培养细胞鲜质量和干质量的新方法[J]. 生物技术通报,1997(2):33-34.
- [6] Mikula A, Niedzielski M, Rybczynski J J. The use of TTC reduction assay for assessment of *Gentiana* spp. cell suspension viability after cryopreservation[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2006, 28(4): 315-324.
- [7] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 2 版. 北京:高等教育出版社,2006:260.
- [8] 饶力群,李劲,官春云,等. 稻白叶枯病菌对水稻悬浮细胞 H_2O_2 含量及其代谢酶活性的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),1999,25(6):437-442.
- [9] 王秋波. 机械刺激诱导的烟草悬浮培养细胞程序性死亡过程及其与 H_2O_2 和 Ca^{2+} -CaM 的关系[D]. 昆明:云南师范大学,2006:13.
- [10] 张志良,瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 3 版. 台北:艺轩图书出版社,2009:121-126.
- [11] Janas K, Kontek R, Posmyk M. Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to Copper stress[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2009(72):596-602.
- [12] Tanyolac D, E K E, Unalan S. Changes in photo chemical land antioxidant enzyme activities in maize leaves exposed to excess Copper[J]. Chemosphere, 2007(67):89-98.
- [13] 黄玉山,罗广华,关荣文. 镉诱导植物的自由基过氧化损伤[J]. Acta Botanica Sinica, 1997(06):522-526.
- [14] Jones M. Programmed cell death in development and defense[J]. Plant Physiology, 2002(125):94-97.
- [15] 廖建良. 铜对金针菇生长的影响试验[J]. 食用菌, 2001(4):9.
- [16] 王蕊,王应军,马星宇. 镉、钼对铜胁迫下豌豆幼苗抗氧化酶系统的影响[J]. 核农学报, 2013, 27(6):873-878.
- [17] 卢进,申明亮. 中药材重金属含量与控制[J]. 中医药管理杂志, 1999(2):33-36.
- [18] Neill J, Desikan R, Clarke A, et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants[J]. Experimental Biology and Medicine, 2002(53):1237-1247.
- [19] del Rio L A, Corpas F J, Sandalio L M, et al. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(372):1255-1272.
- [20] 杜君,李海兰,李慧,等. 铜对葡萄酒酿酒酵母的氧化胁迫机制[J]. 中国农业科学, 2011, 44(2):369-378.
- [21] 韩露,张小平,刘必融. 香根草对重金属铅离子的胁迫反应研究[J]. 应用生态学报, 2005, 16(11):2178-2181.
- [22] 张娜,杨双,童非,等. 铅污染对不同生境芦苇体内抗氧化酶系统的影响[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(2):333-339.
- [23] 张成玲,杨冬静,赵永强,等. 镰刀菌胁迫对不同甘薯品种抗氧化酶及 MDA 含量的影响[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2):263-266.
- [24] 薛盈文,王玉凤,赵长江,等. 铜胁迫对小麦种子萌发及幼苗抗氧化系统的影响[J]. 江西农业大学学报, 2016(1):54-59.
- [25] 王晓维,黄国勤,徐健程,等. 铜胁迫和间作对玉米抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(10):1890-1896.